

T S5/9/1

5/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2002 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010634381

WPI Acc No: 1996-131334/199614

XRAM Acc No: C96-040997

Nucleic acid amplification and opt. detection - using construct comprising complementary strand linked to RNA polymerase promoter.

Patent Assignee: CIS BIO INT (CISB-N); CIS BIO INT SA (CISB-N)

Inventor: BAZIN H; LIVACHE T; SAUVAIGO S

Number of Countries: 019 Number of Patents: 005

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
FR 2723591	A1	19960216	FR 949896	A	19940810	199614 B
WO 9605323	A1	19960222	WO 95FR1047	A	19950803	199614
EP 775217	A1	19970528	EP 95927752	A	19950803	199726
			WO 95FR1047	A	19950803	
EP 775217	B1	19980506	EP 95927752	A	19950803	199822
			WO 95FR1047	A	19950803	
DE 69502402	E	19980610	DE 602402	A	19950803	199829
			EP 95927752	A	19950803	
			WO 95FR1047	A	19950803	

Priority Applications (No Type Date): FR 949896 A 19940810

Cited Patents: EP 427074; EP 545010; FR 2697851; WO 8909285; WO 9002819; WO 9212261

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
FR 2723591	A1		40	C12Q-001/68	
WO 9605323	A1 F		50	C12Q-001/68	
Designated States (National): JP US					
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE					
EP 775217	A1 F			C12Q-001/68	Based on patent WO 9605323
Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE					
EP 775217	B1 F		29	C12Q-001/68	Based on patent WO 9605323
Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE					
DE 69502402	E			C12Q-001/68	Based on patent EP 775217
Based on patent WO 9605323					

Abstract (Basic): FR 2723591 A

Amplification of a nucleic acid sequence comprises: (a) hybridising a target sequence in soln. with a polynucleotide construct comprising a single-stranded (SS) and double-stranded (DS) domains, where the SS domain has a sequence complementary to the target sequence and the DS domain constitutes a promoter; (b) separating the nucleic acids; (c) using a nuclease specific for SS nucleic acids to digest SS fragments of the construct, e.g. those that have not hybridised to the target sequence; (d) transcribing the hybridised target sequence in soln. in the presence of a DNA-dependent RNA polymerase to produce multiple RNA transcripts of the target sequence; and opt. (e) detecting and/or quantifying the transcripts.

USE - Uses for the amplification and opt. detection/quantification method in medical and veterinary diagnosis and food applications are mentioned.

ADVANTAGE - The sensitivity of hybridisation assays can be increased without loss of specificity.

Dwg.0/5

Title Terms: NUCLEIC; ACID; AMPLIFY; OPTION; DETECT; CONSTRUCTION; COMPRISE
; COMPLEMENTARY; STRAND; LINK; RNA; POLYMERASE; PROMOTE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12Q-001/68

International Patent Class (Additional): C07H-021/00

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-E02F; B04-L04A; B11-C08E3; B12-K04F; D05-H09;

D05-H12D1; D05-H18B

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M710 M750 M903 N102 N135 Q233 V753

?

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE D

WO 9605323A1

(51) Classification internationale des brevets 6 : C12Q 1/68		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/05323
			(43) Date de publication internationale: 22 février 1996 (22.02.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01047		(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 3 août 1995 (03.08.95)		Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(30) Données relatives à la priorité: 94/09896 10 août 1994 (10.08.94) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CIS BIO INTERNATIONAL [FR/FR]; Route nationale 306, F-91400 Saclay (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SAUVAIGO, Sylvie [FR/FR]; Le Noyaret, F-38320 Herbès (FR). BAZIN, Hervé [FR/FR]; 2, avenue de Beauvert, F-38000 Grenoble (FR). LIVACHE, Thierry [FR/FR]; 22, rue Félix-Esclançon, F-38000 Grenoble (FR).			
(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).			

(54) Title: METHOD FOR THE AMPLIFICATION AND/OR DETECTION OF A NUCLEIC ACID SEQUENCE, DETECTION REAGENT AND USES THEREOF

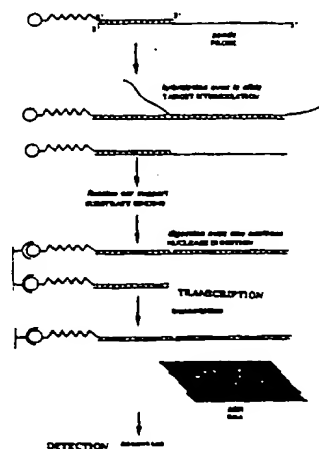
(54) Titre: METHODE D'AMPLIFICATION ET/OU DE DETECTION D'UNE SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE, REACTIF DE DETECTION ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract

Method for the amplification of at least one nucleic acid sequence characterized in that it comprises the steps of (1) solution hybridizing at least one target sequence with a polynucleotidic construct comprising at least one single-strand domain (A) corresponding to a complementary nucleotide sequence of the target sequence and a double strand domain (B, B') forming a promoter, (2) separating the nucleic acids; (3) digesting using a nuclease specific to single strand nucleic acids of polynucleotide constructs, namely those not having produced hybrids with the target sequence, and (4) transcribing, in a solution and in the presence of a DNA dependent RNA-polymerase, the target sequence hybridized in step (1), in the form of multiple RNA copies of the target sequence. According to the method of the invention, the amplified sequence can also be detected or quantified. The invention also concerns the polynucleotide constructs for carrying out the above-mentioned method.

(57) Abrégé

L'invention est relative à un procédé d'amplification d'au moins une séquence d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend: (1) l'hybridation en solution d'au moins une séquence cible avec une construction polynucléotidique comprenant au moins un domaine (A) simple-brin correspondant à une séquence nucléotidique complémentaire de la séquence cible et un domaine (B, B') double-brin constituant un promoteur, (2) la séparation des acides nucléiques, (3) la digestion par une nucléase spécifique des constructions polynucléotidiques, c'est-à-dire notamment celles n'ayant pas formé d'hybrides avec la séquence cible, et (4) la transcription en solution et en présence d'une ARN-polymérase ADN-dépendante, de la séquence cible ayant hybridé à l'étape (1), sous la forme de copies multiples d'ARN de ladite séquence cible, lequel procédé peut comprendre également la détection et/ou la quantification de la séquence amplifiée. L'invention englobe également des constructions polynucléotidiques permettant la mise en œuvre du procédé ci-dessus.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brsil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

**METHODE D'AMPLIFICATION ET/OU DE DETECTION D'UNE SEQUENCE
D'ACIDE NUCLEIQUE, REACTIF DE DETECTION ET LEURS
APPLICATIONS.**

La présente Invention est relative à une
5 méthode d'amplification et/ou de détection d'une séquence
spécifique d'acide nucléique (séquence cible), mettant en
oeuvre une étape d'hybridation, à un réactif approprié à
ladite amplification et/ou détection ainsi qu'à leurs
applications dans le domaine du diagnostic médical et
10 vétérinaire ainsi que dans l'agro-alimentaire pour
l'amplification, la détection et la quantification de
séquences d'acide nucléique.

La détection et/ou la quantification de sé-
quences d'acide nucléiques spécifiques (séquences cibles)
15 est une technique de plus en plus utilisée pour l'identi-
fication et la classification de microorganismes et le
diagnostic des maladies infectieuses.

La technique de base pour réaliser une telle
détection est la méthode d'hybridation simple : cette mé-
20 thode est basée sur la capacité d'association de deux
brins d'acide nucléique qui contiennent des séquences
complémentaires, pour former une séquence double-brin.
Une séquence cible peut ainsi s'hybrider avec une
séquence dénommée sonde. Le marquage préalable de la
25 sonde ou de l'acide nucléique cible permet, après sépara-
tion de l'hybride et de la sonde résiduelle simple-brin,
la détection du duplex formé. Cette méthode, relativement
simple à mettre en oeuvre présente, toutefois, un certain
nombre d'inconvénients : elle manque généralement de sen-
30 sibilité pour les applications en diagnostic médical ; de
plus, les méthodes de détection de l'hybride formé font
appel à des techniques qui ne sont pas compatibles avec
une utilisation en routine de ces essais.

Pour pallier ce manque de sensibilité des
35 tests d'hybridation et essayer de conserver une bonne
spécificité du test, de nombreuses améliorations de cette
technique de base ont été développées et concernent :

- soit l'automatisation du test : faciliter la séparation des duplex séquence cible-sonde formés par couplage par hybridation à un support solide,

- soit essentiellement la sensibilité : amplifier de façon spécifique les séquences cibles, de manière à rendre la détection effectivement plus sensible. Plusieurs méthodes ont été proposées pour amplifier les séquences cibles :

la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction ou PCR) décrite par MULLIS et al. (Brevets US 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, EP 86302298.4, 86302299.2 et 87300203.4) est un processus cyclique à trois températures, basé sur l'extension par une ADN polymérase de deux amorces spécifiques hybridées sur la séquence cible et qui permet l'amplification exponentielle de la séquence recherchée. Ce système nécessite la répétition séquentielle des séquences suivantes : dénaturation de l'ADN cible, hybridation des amorces sur les brins complémentaires de la séquence cible et élongation par une ADN polymérase des extrémités 3' des amorces en regard. Une polymérase thermostable est généralement utilisée et le processus se déroule de façon entièrement automatique dans des appareils spécifiques. Cette technique a l'inconvénient majeure d'être trop sensible et d'entraîner des résultats faussement positifs.

une variante de la PCR, connue sous le nom de Ligase Chain Reaction (LCR) (Brevet EP 0 320 308), qui nécessite 4 sondes oligonucléotidiques, est basée sur la ligation par une ligase de deux de ces sondes oligonucléotidiques, s'hybridant conjointement sur la même séquence cible.

Ces deux sondes oligonucléotidiques ont la particularité d'être contigües sur le brin cible, par l'extrémité 3' de l'un et l'extrémité 5' de l'autre.

les propriétés des ARN polymérase ADN-dépendantes extraites de bactériophages, sont également utilisées dans des systèmes d'amplification, et permettent

l'obtention de nombreuses copies de transcrits. Par exemple, l'amplification PCR a été couplée à l'amplification par transcription grâce à l'incorporation de séquences promoteur d'ARN polymérase dans l'une ou dans les deux
5 amorces d'amplification. L'ADN double-brin amplifié sert de substrat pour la transcription d'ARN simple-brin (MURAKAWA et al., DNA, 1988, 7, 287-295) ou double-brin (Demande Internationale PCT WO 93/12229, au nom de la Demanderesse).

10 Ceci est également le cas dans une méthode d'amplification, basée sur la transcription, dénommée la TAS (Transcription Amplification System) (Demande Internationale PCT WO 88/10315). Dans cette méthode, des amorces contenant le promoteur d'une ARN polymérase sont
15 hybridées avec une séquence cible et leur extension est réalisée à l'aide d'une ADN polymérase. L'ADN double-brin résultant est transcrit en ARN qui peut lui-même servir de matrice pour l'hybridation des amorces et donc la transcription de nouvelles séquences d'ARN.

20 D'autres méthodes basées sur la production de transcrits, pour amplifier une séquence à détecter, ont été également décrites :

. la Demande de Brevet EP 0 587 266, au nom de GEN-PROBE INCORPORATED, décrit une méthode d'amplification d'acide nucléique, qui comprend :

25 (i) l'incubation d'un mélange consistant essentiellement en la séquence nucléique à détecter (ARN ou ADN) avec un ou plusieurs oligonucléotides dits "promoteurs-amorces", comprenant une séquence suffisamment complémentaire de l'extrémité 3' de la séquence-cible à hybrider, servant d'amorce et un promoteur pour
30 une ARN polymérase, et

(ii) la formation d'un hybride promoteur-amorce/séquence cible.

35 . L'article paru dans Clin. Chem., (1993, 39, 9, 1934-1938) et la Demande de Brevet EP 0 427 073, au

nom de MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC., décrivent une sonde d'ADN qui peut être amplifiée transcriptionnellement, la-dite sonde ayant une structure en épingle à cheveux, comprenant une séquence complémentaire d'une séquence cible à détecter et une séquence promoteur double-brin.

Un autre système d'amplification est basé sur le couplage d'une sonde ARN à de l'ARN (Brevet US 4,786,600) qui sert de substrat à la Q- β -réplicase, permettant la synthèse de copies multiples de la sonde.

La Demande Internationale PCT WO 91/10746, au nom de CHIRON CORPORATION, décrit une amplification du signal après hybridation par l'intermédiaire de séquences promoteur d'ARN polymérase couplées à une sonde, qui entraîne la production de transcrits complémentaires d'une matrice associée au promoteur mais différente de la séquence cible (Toutefois, l'ensemble de ces améliorations, si elles conduisent à une augmentation de la sensibilité, ont pour conséquence une perte de spécificité.

Pour pallier cet inconvénient, la présente Invention s'est en conséquence donné pour but de pourvoir à un réactif et à une méthode aptes à améliorer de manière significative la sensibilité des tests d'hybridation, tout en conservant la spécificité de la reconnaissance de la séquence cible obtenue avec les sondes, ce qui répond mieux aux besoins de la pratique que les réactifs et méthodes de l'Art antérieur.

La présente invention a pour objet un procédé d'amplification d'au moins une séquence d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) l'hybridation en solution d'au moins une séquence cible avec une construction polynucléotidique comprenant au moins un domaine (A) simple-brin correspondant à une séquence nucléotidique complémentaire de la séquence cible et un domaine (B,B') double-brin constituant un promoteur.

(2) la séparation des acides nucléiques,

(3) la digestion par une nucléase spécifique des acides nucléiques simple-brin des fragments simple-brin des constructions polynucléotidiques, c'est-à-dire
5 notamment celles n'ayant pas formé d'hybrides avec la séquence cible, et

(4) la transcription en solution et en présence d'une ARN-polymérase ADN-dépendante, de la séquence cible ayant hybridé à l'étape (1), sous la forme de
10 pies multiples d'ARN de ladite séquence cible.

On entend par séquence cible, au sens de la présente invention, aussi bien de l'ADN double-brin, de l'ADN simple-brin, de l'ARN double-brin que de l'ARN simple-brin.

15 Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé d'amplification, l'étape (2) de séparation comprend avantageusement une étape de précipitation des acides nucléiques.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé d'amplification, la construction polynucléotidique de l'étape (1) comprend au moins un domaine
20 (A) simple-brin correspondant à une séquence nucléotidique complémentaire de la séquence cible, un domaine (B,B') double-brin constituant un promoteur, un domaine
25 (C) constitué par un bras espaceur, non hydrolysable par des nucléases spécifiques des acides nucléiques simple-brin et un domaine (D) constitué par un système de fixation à un support.

Les domaines (C) et (D) sont plus précisément
30 définis ci-dessous.

Conformément à ce mode de mise en oeuvre, l'étape (2) de séparation comprend avantageusement une étape de fixation sur un support approprié des constructions polynucléotidiques comportant le domaine (D), suivie d'une étape d'élimination des éléments non fixés.
35

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, la capacité du support est choisie de

telle sorte que tous les composés comportant le domaine (D) puissent se fixer, sans qu'il y ait compétition entre eux.

De manière préférée, le support présente les caractéristiques suivantes :

- il est choisi parmi les tubes, les microplaques et les microbilles,
- il est recouvert d'une substance apte à fixer le domaine (D), telle que de l'avidine,
- 10 - il présente une capacité de fixation supérieure ou égale à 8 pmoles de domaines (D), notamment constitué par de la biotine,
- le rapport entre la capacité du support, en pmoles et le nombre de pmoles d'espèces présentes en solution et présentant une affinité avec ledit support est
15 supérieure à 1.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection et/ou de quantification d'au moins une séquence d'acide nucléique, caractérisé en ce
20 qu'il comprend, outre les étapes (1), (2), (3) et (4) précitées, à savoir : (1) l'hybridation en solution d'au moins une séquence cible avec une construction polynucléotidique comprenant au moins un domaine (A) simple-brin correspondant à une séquence nucléotidique complé-
25 mentaire de la séquence cible et un domaine (B,B') double-brin constituant un promoteur, (2) la séparation des acides nucléiques, (3) la digestion par une nucléase spécifique des acides nucléiques simple-brin des fragments simple-brin des constructions polynucléotidiques,
30 c'est-à-dire notamment celles n'ayant pas formé d'hybrides avec la séquence cible à détecter, et (4) la transcription en solution et en présence d'une ARN-polymérase ADN-dépendante, de la séquence cible ayant hybridé à l'étape (1), sous la forme de copies multiples d'ARN de
35 ladite séquence cible,

(5) la détection et/ou la quantification des transcrits produits.

L'étape (4) de transcription et l'étape (5) de détection du transcrit par hybridation d'une sonde peuvent avoir lieu simultanément.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé de détection, l'étape (2) de séparation comprend avantageusement une étape de précipitation des acides nucléiques.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé de détection, la construction polynucléotidique de l'étape (1) comprend au moins un domaine (A) simple-brin correspondant à une séquence nucléotidique complémentaire de la séquence cible, un domaine (B,B') double-brin constituant un promoteur, un domaine (C) constitué par un bras espaceur, non hydrolysable par des nucléases spécifiques des acides nucléiques simple-brin et un domaine (D) constitué par un système de fixation à un support.

Conformément à ce mode de mise en oeuvre, l'étape (2) de séparation comprend avantageusement une étape de fixation sur un support approprié des constructions polynucléotidiques comportant le domaine (D), suivie d'une étape d'élimination des éléments non fixés.

Dans ce cas, l'étape (2) de fixation sur un support, après hybridation avec la séquence cible, des ensembles construction polynucléotidique/séquence cible permet d'éliminer les composés présents dans le milieu d'hybridation et d'effectuer facilement les lavages nécessaires après chaque étape du procédé.

De manière générale, l'étape (3) de digestion nucléasique, qui est essentielle aussi bien dans la mise en oeuvre du procédé d'amplification que du procédé de détection, permet d'éliminer les domaines (A) n'ayant pas réagi (absence d'hybridation), assurant ainsi une spécificité importante auxdits procédés, tout en ayant une sensibilité significativement améliorée, par rapport aux tests d'hybridation et/ou d'amplification classiques.

En effet, lorsque le domaine (A) (complémentaire de la séquence cible à amplifier ou à détecter) est digéré, il ne peut plus servir de matrice à la transcription et celle-ci n'a pas lieu. Certaines enzymes spécifiques des simples-brins vont laisser intacts des nucléotides courts (1 à 6 bases de long) simple-brin, après digestion ; toutefois, lorsque cela se produit, les transcrits obtenus sont de petite taille (maximum 6 nucléotides de long) et peuvent être aisément distingués des transcrits présentant la taille du domaine (A).

Lorsque le domaine (A) est hybridé de façon parfaite avec la séquence cible, il est protégé de l'action des nucléases spécifiques des simples-brins et peut servir de matrice pour la transcription.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux desdits procédés (amplification et détection), l'étape (1) comprend simultanément la formation in situ de la construction polynucléotidique par hybridation d'une séquence comprenant au moins de 5' en 3' le domaine (A) et le domaine (B) avec une séquence comprenant au moins le domaine (B') et de préférence en outre le domaine (D) et le domaine (C) et l'hybridation de ladite construction polynucléotidique ainsi formée et de la séquence cible.

Dans le cas où la construction polynucléotidique comprend les domaines (D) et (C), l'étape (2) de fixation sur un support, après hybridation avec la séquence cible, des ensembles construction polynucléotidique/séquence cible et séquences comprenant le domaine (D), le domaine (C) et le domaine (B') non appariées permet d'éliminer les composés présents dans le milieu d'hybridation et d'effectuer facilement les lavages nécessaires après chaque étape desdits procédés, et l'étape (3) permet la digestion des domaines (A) non appariés et des constructions incomplètes (domaine (B') non apparié au domaine (B)). Par contre, le bras espaceur n'est pas digéré.

En ce qui concerne plus précisément la mise en oeuvre du procédé de détection conforme à l'invention : l'étape (4) de transcription est réalisée en présence de désoxynucléotides modifiés tels que l' α -³²P-UTP, le dinitrophényl-UTP, la biotine-UTP, la digoxigénine-UTP. Ceci permet l'incorporation dans les transcrits, de marqueurs, pouvant servir à leur détection et à leur quantification, lors de l'étape (5) mise en oeuvre dans le procédé de détection.

Conformément à l'invention, lorsque les transcrits sont réalisés en présence de désoxynucléotides modifiés, l'étape (5) de détection comprend la capture desdits transcrits modifiés par une sonde spécifique d'une portion située au centre ou à l'extrémité 3' desdits transcrits et la détection des marqueurs incorporés dans lesdits transcrits par des systèmes de révélation convenables.

Selon ce dernier mode de mise en oeuvre du procédé de détection, la sonde de détection fait avantageusement entre 15 et 200 bases de long et peut être modifiée à une de ses extrémités par une molécule permettant sa fixation sur un support. Cette molécule de fixation est préférentiellement un haptène ou une biotine.

En variante, le transcrit et sa sonde de détection peuvent être hybridés en solution, dans des conditions favorisant la formation du duplex spécifique et les hybrides ainsi formés peuvent être immobilisés sur supports modifiés.

Selon encore une autre variante, l'immobilisation de la sonde sur le support peut être préalable à l'étape de détection (immobilisation sur microbilles par exemple et addition des microbilles dans le milieu de transcription).

Les transcrits non modifiés (non marqués) peuvent être également détectés après leur fixation sur support (dépôt par dot-blot sur membrane de nylon, par

exemple), par hybridation avec une sonde de détection spécifique marquée, telle que définie ci-dessus.

Aussi bien le procédé d'amplification que le procédé de détection répondent au besoin exposé ci-dessus, à savoir ils sont à la fois sensibles et spécifiques ; en particulier, dans le cas de la mise en oeuvre d'une construction polynucléotidique comprenant un domaine (C) et un domaine (D), seule la matrice nécessaire à la transcription est fixée sur le support ; en conséquence, le milieu de transcription ne contient que les transcrits spécifiques de la séquence cible à détecter.

La présente invention a également pour objet une construction polynucléotidique apte à amplifier et/ou à détecter une séquence cible d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle comprend :

(a) un premier domaine (A), qui est simple-brin et comprend une séquence nucléotidique complémentaire de la séquence cible,

(b) un deuxième domaine (B,B'), situé à l'extrémité 3' dudit domaine (A), qui est formé de deux séquences complémentaires (B) et (B') et forme un promoteur double-brin d'une ARN polymérase ADN-dépendante,

(c) un troisième domaine (C), constitué par un bras espaceur, non hydrolysable par des nucléases spécifiques des acides nucléiques simple-brin, et

(d) un quatrième domaine (D), constitué par un système de fixation du domaine (B,B') sur un support solide convenable,

lesquels domaines (C) et (D) peuvent être avantageusement fixés soit en 5' du domaine (B'), soit en 5' du domaine (A), soit en 3' du domaine (B).

Ladite construction polynucléotidique comprend donc un segment, également dénommé sonde ci-après, qui correspond soit aux domaines (D)+(C)+3'-(B)+(A)-5', soit aux domaines 3'-(B)+(A)-5'+(C)+(D), soit aux domaines 3'-(B)+(A)-5' et un segment, également dénommé promoteur ci-après, qui correspond soit aux domaines

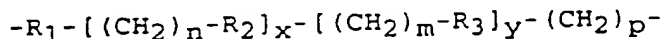
(D)+(C)+5'-(B')-3', soit au domaine (B'), selon le lieu d'accrochage des domaines (C) et (D).

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite construction, le domaine (B,B') constitue l'un des promoteurs suivants : promoteur de la T7 ARN polymérase, promoteur de la T3 ARN polymérase, promoteur de la SP6 ARN polymérase ; également de manière avantageuse, des bases G ou C peuvent être ajoutées à l'extrémité 3' du domaine B, de façon à améliorer la cohésion de la partie double-brin de ladite construction. L'ajout de telles bases ne modifie toutefois pas les rendements ultérieurs de transcription.

Des séquences peuvent également être ajoutées à l'extrémité 5' dudit domaine B, avant la région correspondant à la séquence complémentaire de la séquence cible (domaine (A)).

Conformément à l'invention, la taille de la séquence formée par les domaines (A) et (B) est comprise entre 30 et 200 bases.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le domaine (C) ou bras espaceur est avantageusement constitué de 2 à 10, de préférence de 4 à 6 synthons, choisis parmi les alcanes-diol ou les synthons décrits dans la Demande Internationale PCT/FR94/00354, au nom de la Demanderesse, qui répondent à l'une des formules suivantes :



dans laquelle :

n est un nombre entier de 1 à 10 ;

m est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 10 ;

p est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 10 ;

x est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 8 ;

y est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 8 ;

R₁, R₂ et R₃, qui peuvent être identiques ou différents représentent

CH₂ ; O ; S ; NR' ; CO ; CH=CH ; NR'CO ; CONR' ; NHSO₂ ; R'PO₄,

où R' représente un atome d'hydrogène ou une chaîne alkyle en C₁ à C₁₂.

De tels bras espaceurs éloignent le promoteur du support solide sur lequel il est susceptible de se fixer, afin de permettre effectivement la transcription en ARN, par l'accrochage de l'ARN polymérase sur le promoteur double-brin, en évitant ainsi tout problème d'encombrement stérique.

Ils peuvent avantageusement être obtenus par incorporation de synthons tels que définis ci-dessus pendant la synthèse oligonucléotidique du domaine (B'), comme décrit notamment dans WILK et al. (Nucleic Acids Res., 1990, 18, 8, 2065-2068), tel que le synthon C-16-spacer[®] PA (Cambridge Research Biochemicals), à partir de dérivés phosphoramidites de squelettes carbonés, du type 1-O-diméthoxytrityl-butane-3-O-(2-cyanoéthyl-N,N-diisopropyl) phosphoramidite ou selon la méthode décrite dans la Demande Internationale PCT/FR94/00354 précitée.

Egalement conformément à l'invention, le domaine (D) est une molécule pouvant avoir une affinité pour une autre molécule immobilisable sur support solide ; avantageusement il s'agit d'un oligonucléotide, d'un haptène, du dinitrophényle, d'une biotine, ou d'une digoxigénine.

La construction polynucléotidique conforme à l'invention permet la synthèse de transcrits d'ARN, dont la séquence correspond à la séquence cible, en présence d'ARN polymérase-ADN dépendante. 10 à 10⁴ transcrits peuvent être obtenus à partir d'une seule molécule de séquence cible, permettant ainsi l'amplification de la séquence cible et ainsi un accroissement significatif de la sensibilité.

La présente invention a également pour objet un procédé de production d'une construction polynucléotidique conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend :

(a) la synthèse du segment dénommé promoteur comprenant le domaine (D) (système d'accrochage), le domaine (C) (bras espaceur) et le domaine 5'-(B')-3' (correspondant à un simple-brin d'un promoteur),

5 (b) la synthèse du segment dénommé sonde, comprenant le domaine 3'-(B) (correspondant à une séquence simple-brin complémentaire de (B')), le domaine (A)-5' (séquence simple-brin complémentaire de la séquence cible à détecter) et

10 (c) l'hybridation des domaines (B) et (B'), des segments obtenus en (a) et (b), dans des conditions stringentes.

Conformément à ce procédé, l'étape (b) comprend la synthèse chimique dudit fragment, notamment à
15 l'aide de la technologie des PAC-phosphoramidites.

En variante, l'étape (b) comprend une amplification PCR asymétrique d'une séquence cible témoin avec des amorces spécifiques de ladite séquence cible, l'une desdites amorces comportant la séquence (B) à son extré-
20 mité 5'.

En variante, ledit procédé de production d'une construction polynucléotidique conforme à l'invention, comprend :

(a) la synthèse du segment dénommé promoteur
25 comprenant uniquement le domaine 5'-(B')-3' (correspondant à un simple-brin d'un promoteur),

(b) la synthèse du segment dénommé sonde, comprenant le domaine (B) (correspondant à une séquence simple-brin complémentaire de (B')), le domaine (A)-5' (séquence simple-brin complémentaire de la séquence cible à détecter) et en 3' ou en 5' dudit segment, le domaine
30 (C) (bras espaceur) et le domaine (D) (système d'accrochage), et

(c) l'hybridation des domaines (B) et (B'),
35 des segments obtenus en (a) et (b), dans des conditions stringentes.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention, ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 représente une construction polynucléotidique conforme à l'invention.
- la figure 2 illustre le procédé de détection (et/ou de quantification) d'au moins une séquence cible, conforme à l'invention.
- les figures 3, 4 et 6 illustrent l'augmentation significative de la sensibilité du test d'hybridation par le procédé conforme à l'invention.
- la figure 5 représente une autre construction polynucléotidique conforme à l'invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Préparation de la construction.

a) Synthèse du promoteur (Y) :

(Y) 5' biotine-[stop]₅-CCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GG 3'.

- Synthèse du phosphoramidite "stop" :

6-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-hexane-1-O-(2-cyanoéthyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidite.

L'hexane-1,6-diol (11 g ; 0,1 mole) est dissous dans le dichlorométhane (150 ml) ; on ajoute de la triéthylamine (22 ml) et de la diméthylaminopyridine (1 g), puis sous agitation (0 à 4°C), on ajoute une solution de 6,8 g (20 mmoles) de chlorure de diméthoxytrityle (DMT) dans 50 ml de dichlorométhane.

Après 2 heures sous agitation, le mélange est lavé par 200 ml de NaHCO₃ (solution aqueuse à 10 %), puis par 2 X 200 ml d'eau.

La phase organique est évaporée, puis le composé brut est purifié sur une colonne de silice (silice PF Merck) par chromatographie-flash, en éluant avec un mélange dichlorométhane/hexane (1:1) contenant 1 % de triéthylamine.

Les fractions renfermant le produit monotri-tylé de $R_f = 0,64$ dans le mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$ (5:2) sont réunies et évaporées puis co-évaporées au tétrachlorure de carbone. Rendement 3,8 g (51 %).

Le composé monotri-tylé obtenu ci-dessus (1,41 g, 3,35 mmoles) est co-évaporé sous-vide par 2 X 20 ml d'acétonitrile anhydre, puis dissous dans 35 ml de dichlorométhane anhydre. On ajoute 285 mg de tétrazole de diisopropylammonium, puis 4 ml d'une solution de 2-cyanoéthyl-N,N,N',N'-tétraisopropylphosphorodiamidite (1M dans l'acétonitrile anhydre).

Après 150 min de réaction sous argon et sous agitation, à 20°C, le mélange réactionnel est dilué par 100 ml de dichlorométhane, puis lavé par 2 X 100 ml de NaHCO_3 (solution aqueuse à 10 %) puis par 2 X 100 ml d'une solution de NaCl à demi-saturation.

La phase organique est concentrée et le résidu est purifié sur une colonne de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/hexane (20/80) contenant 1 % de triéthylamine.

Après évaporation des solvants, le résidu sirupeux est repris par du benzène anhydre, puis lyophilisé sous-vide. Rendement 1,7 g (80 %).

$R_f = 0,4$ dans le mélange Hexane/ Et_2O / Et_3N (15/10 /1).

RMN-1H (CD_3COCD_3) : 7,6-7,3 (m, 9H) DMT ; 7,1-6,9 (m, 4H) DMT ; 3,9 (s, 6H) 2 X CH_3O ; 3,8-3,6 (m, 6H) CH_2OP ; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$; 2 X CHipr ; 3,25-3,15 (m, 2H) CH_2ODMT ; 2,84 (t, 2H) CH_2CN ; 1,8-1,65 (m, 8H) CH_2 ; 1,30 (m, 12H) 4 X CH_3 .

RMN-31P (C_6D_6) : 149,3 ; SM(FAB+) : $\text{MNa}^+ = 643$.

- Promoteur proprement dit : domaine (D)+(C)+(B') :

La séquence du promoteur (23-mer) est synthétisée sur un synthétiseur d'oligonucléotide Applied Biosystems, en utilisant une colonne de 1 μ mole.

Le rendement moyen par étape est de 98,2 %. L'oligonucléotide (23-mer) reste tritylé à son extrémité 5'.

On couple alors 5 fois de suite le phosphoramidite "stop" décrit ci-dessus, en utilisant une solution (0,1M dans l'acétonitrile anhydre) placée sur la voie "X" du synthétiseur (séquence XXXXXT ; DMT "ON").

Le rendement moyen par étape est de 98,4 % (mesure photométrique à 500 nm).

Le dérivé biotine phosphoramidite (ROGET A., BAZIN H. et TEOULE R., Nucleic Acids Res., 1989, 17, 7643-7651) est alors couplé à l'extrémité 5' du dérivé de 28-mers obtenu précédemment, en laissant le groupe diméthoxy tritylé en 5' de l'oligodésoxynucléotide.

L'oligonucléotide Y (29-mers) alors obtenu est alors déprotégé pendant 16 h à 55°C dans l'ammoniaque à 28 % (tube scellé) et correspond au segment dénommé promoteur ci-dessus et comportant, comme domaine (D), de la biotine, comme domaine (C) le bras espaceur [stop]₅ tel que préparé ci-dessus et comme domaine (B'), la séquence de 23 mers ci-dessus.

Après évaporation de l'ammoniaque, on obtient 103 μ g d'oligonucléotide Y brut, qui est repris par 200 μ l de TEAB 10 mM (triéthylammonium bicarbonate) et injecté sur une colonne HPLC (RP-18, Merck).

On utilise une colonne Lichrosphère Merck 250 X 10 mm RP-18E (10 μ m) avec un gradient de 10 % à 32 % d'acétonitrile dans le TEAA 25 mM (triéthylammonium acétate) en 20 minutes, à un débit de 5 ml/min.

La fraction correspondant au pic principal (19 min < Rt < 20,5 min) est collectée, le produit est éva-

poré à sec, puis repris dans 1 ml d'acide acétique à 80 %. Après 25 min à 20°C, l'acide acétique est évaporé sous-vide.

Le résidu est repris dans 200 µl de TEAB 10 mM et dessalé sur une colonne NAP5 (Pharmacia), on obtient ainsi 12UA₂₆₀ de promoteur Y.

b) Synthèse de la sonde (X) : domaines (B)+(A)

De manière préférée, le domaine (A), constituant une sonde, est obtenu par synthèse chimique classique d'oligonucléotides. Dans ce cas, la technologie des PAC-phosphoramidites (voir Brevet français 2 596 761) peut avantageusement être utilisée, afin, notamment d'assurer une meilleure déprotection de l'oligonucléotide final. Une bonne déprotection est importante, afin d'éviter l'arrêt prématuré de la réaction et limiter les mauvaises incorporations pendant la transcription. (Milligan et al., Methods Enzym., 1989, 180, 51-62). Ledit domaine A peut également être obtenu par amplification PCR asymétrique avec des amorces spécifiques de la séquence cible, dont l'une comporte la séquence (B) à son extrémité 5'. Les quantités d'amorces utilisées sont choisies de façon à ce que le simple-brin résultant de l'amplification corresponde à la séquence 3'(B)-(A) 5'. Cette séquence simple-brin est ensuite purifiée après séparation électrophorétique et extraction du gel par des techniques classiques.

De manière plus précise, la sonde (X) est synthétisée sur un synthétiseur Applied Biosystems en utilisant une colonne de 0,2 µmole.

Pour cette synthèse, les phosphoramidites du type PAC (Phenoxyacetic) sont utilisés (SCHULHOF JC., MOLKO D. et TEOULE R., Nucleic Acids Res., 1987, 15, 397-416).

Le dernier groupe diméthoxytrityle en 5' est conservé à l'issue de la synthèse.

L'oligonucléotide est alors déprotégé par l'ammoniaque à 28 % (2,4 ml) pendant 16 h.

On évapore la solution ammoniacale, on reprend le résidu par 200 µl de TEAB ; après dessalage sur une
5 colonne NAP5 (Pharmacia), on obtient 44UA₂₆₀ d'oligonucléotide brut.

Après concentration, on injecte sur HPLC (colonne Merck RP-18), colonne RP-18E (5 µm), 125 X 4 mm en éluant avec un gradient de 10 % à 18 % d'acétonitrile
10 en 15 min, puis de 18 % à 50 % d'acétonitrile dans le TEAA 25 mM en 15 min, à un débit de 1 ml/min. On collecte la région centrale du pic (20,6 min < Rt < 23,0 min).

On évapore la fraction correspondante et on détrityle (acide acétique 80 %, 20°C, 25 min), puis on
15 évapore à sec sous-vide, on reprend par 200 µl de TEAB 10 mM et on précipite par 2 ml de n-butanol. On obtient ainsi 5 UA₂₆₀ d'oligonucléotide X pur, comprenant le domaine (A), représenté en caractères gras et le domaine (B), représenté en caractères soulignés, suivants :

20 (X) 5' GCC GCT GAA GGG CTT CTT CCT TAT TGA TGC CCC TAT
AGT GAG TCG TAT TAG G 3' (voir figure 5).

c) Hybridation des brins X et Y.

La sonde (X) (4,4 pmoles) et le promoteur (Y) (7,2 pmoles) sont hybridés 15 minutes à 50°C, après 5 min
25 de dénaturation à 99°C, dans 50 µl de tampon SSC 5X, en présence de 10 µg d'ADN de sperme de hareng.

Le duplex ainsi formé peut être stocké et utilisé directement pour l'hybridation avec une cible simple-brin, par exemple, sans étape de dénaturation.

30 Il peut éventuellement être purifié, afin d'éliminer les promoteurs (Y) non hybridés à la sonde (X).

EXEMPLE 2 : Résistance du bras espaceur selon l'exemple 1 à l'hydrolyse par les nucléases spécifiques des simples-brins nucléotidiques.

Le promoteur (Y) (3 µl à 0,6 unités de DO) est
5 marqué à son extrémité 5' sur le résidu biotinylé, par la polynucléotide kinase en présence de 3 µl de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, dans un volume total de 10 µl. 3 µl de la solution de marquage sont utilisés directement pour tester la résistance de l'oligonucléotide modifié à l'hydrolyse par les
10 nucléases.

Deux enzymes sont testées : la nucléase S1 (Boehringer-Mannheim, 400 U/µl) et la Mung-Bean-Nucléase (Boehringer-Mannheim, 50 U/µl).

* Digestion par la Mung-Bean-Nucléase :

15	promoteur Y marqué	3 µl
	Tampon 5X	2 µl
	ADN de sperme de hareng	2 µl (10 mg/ml)
	Enzyme	0,1 µl
	H ₂ O	2,9 µl

20 Incubation 30 minutes à 37°C.

* Digestion par la Nucléase S1 :

	promoteur Y marqué	3 µl
	Tampon 3X	3,3 µl
	ADN de sperme de hareng	2 µl (10 mg/ml)
25	Enzyme	0,1 µl
	H ₂ O	1,6 µl

Incubation 30 minutes à 37°C.

Les réactions de digestion sont arrêtées par
addition de 2 µl d'EDTA 0,5 M. 5 µl des solutions de
30 digestion sont déposés sur gel d'acrylamide à 25 %, avec le témoin marqué non digéré. Des marqueurs de longueur, marqués au ^{32}P , sont conjointement déposés sur le gel.

L'autoradiographie montre une disparition totale de l'oligonucléotide initial après digestion par la Mung-Bean-Nuclease et une digestion supérieure à 98 % pour la nucléase S1 ; on observe des résidus très majoritaires (> à 95 %), dans les deux réactions de digestion, dont la taille est d'environ 8 à 9 nucléotides (comparaison avec des marqueurs de longueur). L'oligonucléotide étant marqué à son extrémité 5', ces résidus comprennent le bras espaceur comportant la biotine à son extrémité 5' avec deux ou trois résidus nucléotidiques non hydrolysés à son extrémité 3'.

EXEMPLE 3 : Test de la capacité de transcription de la construction polynucléotidique selon l'exemple 1, fixée sur un support modifié.

Une construction polynucléotidique telle que préparée à l'exemple 1, en solution, est transférée dans des puits de microplaques recouverts d'avidine. La fixation se déroule dans du tampon SSC 5X, 1 heure à 37°C. Les puits sont lavés dans un tampon PBS + NaCl 0,5 M. La transcription se déroule ensuite en présence de 1 mM de chacun des quatre nucléosides triphosphate, de 0,2 µl de α-³²P-UTP (Amersham, 800 Ci/mmol, 20 mCi/ml), et de 50 U de T7 ARN polymérase (Gibco-BRL).

La réaction se déroule 2 heures à 37°C. 7 µl de surnageant de transcription sont prélevés et analysés après migration sur gel d'agarose/Nusieve® (1 %/2 %) et visualisation au bromure d'éthidium ou bien après électrophorèse sur gel d'acrylamide à 25 % et autoradiographie.

L'analyse du gel d'agarose montre une bande très majoritaire de taille identique à celle du domaine A de la sonde (X) dans les puits contenant de la T7 ARN polymérase. Des fragments plus courts minoritaires sont en outre observés. Ces fragments correspondent à des initiations de transcription avortées (Milligan et al., NAR, 1987, 15, 21, 8783-8798). Les puits témoins, où la trans-

cription est effectuée sans enzyme, ne contiennent aucun acide nucléique détectable sur gel. L'analyse des mêmes échantillons sur gel d'acrylamide montre une bande très majoritaire correspondant au transcrit intégral dans les puits contenant l'enzyme de transcription et aucune bande dans les puits témoins ou la transcription est effectuée sans enzyme.

EXEMPLE 4 : Mise en évidence de la protection de la transcription vis-à-vis de la digestion du domaine (A) de la sonde par des nucléases spécifiques des simple-brins, par hybridation dudit domaine (A) de la sonde avec une séquence complémentaire.

Cet exemple montre la protection de la transcription par hybridation du domaine (A) de la sonde (X) avec une séquence cible complémentaire, lors de l'étape de digestion par les nucléases spécifiques des simple-brins :

5,7 pmoles d'un oligonucléotide synthétique (G) de séquence :

5' CAT CAA TAA GGA AGA AGC CCT TCA GCG GC 3'

sont ajoutés dans le milieu d'hybridation de l'exemple 1. Cet oligonucléotide a une séquence parfaitement complémentaire du domaine (A) de la sonde. Les espèces présentes sont hybridées et fixées en microplaque comme décrit dans l'exemple 1 et l'exemple 3 ; les puits sont ensuite incubés 30 min à 37°C dans des tampons de digestion contenant la nucléase S1 ou la Mung-Bean-Nuclease et 0,05 mg/ml de BSA.

Après lavages dans un tampon PBS + NaCl 0,5 M + Tween 20 0,05 %, le milieu de transcription est ajouté dans les puits. La transcription se déroule comme dans l'exemple 3 et les produits sont également analysés comme décrit précédemment.

Après digestion par la Mung-Bean (25 U dans 50 µl) ou par la Nucléase S1 (20 U dans 50 µl), on

observe le transcrit de la taille attendue sur gel d'agarose et après autoradiographie.

EXEMPLE 5 : Effet de la digestion du domaine (A) de la sonde sur l'efficacité de la transcription, en l'absence
5 de séquence complémentaire de (A) pendant la digestion par les nucléases spécifiques des simples-brins : spécificité du test conforme à l'invention.

La sonde (X) et le promoteur (Y) sont hybridés en solution, fixés sur microplaque recouverte d'avidine,
10 digérés et transcrits comme cela est décrit dans les exemples précédents.

L'analyse des produits de transcription par gel d'agarose et par autoradiographie montre l'absence totale, dans les conditions de digestion définies ci-dessus,
15 du transcrit intégral correspondant à la sonde. Le domaine (A) de la sonde non protégé par hybridation est donc digéré pendant l'étape de digestion par les nucléases spécifiques des simples-brins et ceci empêche la production par transcription de l'ARN correspondant au
20 domaine (A) de la sonde.

Ces exemples montrent que le domaine (A) non protégé des nucléases spécifiques des simples-brins est digéré par ces enzymes et que l'ensemble promoteur/sonde digéré n'est plus capable de donner lieu à la transcrip-
25 tion du produit attendu. Ils montrent, en outre, que le domaine (A) est protégé de la digestion par les enzymes lorsqu'il est sous la forme d'un double-brin et que l'ensemble construction polynucléotidique/cible donne lieu à une transcription spécifique.

30 L'exemple 4 montre également que les enzymes testées ne sont pas capables d'induire la coupure de la sonde, entre les domaines (A) et (B) lorsque la cible est parfaitement hybridée sur (A).

EXEMPLE 6 : Détection d'une séquence cible par le procédé conforme à l'invention (détection du transcrit par hybridation sur membrane).

a) Préparation de la séquence cible :

5 La séquence cible est constituée d'un ARN de 150 bases de long, reconnu par le domaine (A) de la construction polynucléotidique selon l'exemple 1 et est obtenue à partir d'un ARNm extrait de tissus d'un patient atteint de leucémie lymphocytaire sévère (ALL, jonction
10 b₂A₂).

Des dilutions séquentielles de cet ARN sont effectuées (voir résultats ci-après). Le procédé selon l'invention est réalisé sur chacune des dilutions de l'ARN cible.

15 b) Amplification conforme à l'invention :

La construction polynucléotidique selon l'invention, comprend la sonde (X) 4,4 pmoles et le promoteur (Y) 7,2 pmoles et les dilutions de la cible sont hybridés en solution comme décrit dans l'exemple 3 en présence de
20 10 µg d'ADN de sperme de hareng. Après fixation en microplaque, digestion par 16 U de Mung-Bean-Nucléase, en présence de 0,05 mg/ml de BSA, et transcription comme décrit ci-dessus en présence de 1 mg/ml de Tween 20, les produits de transcription sont analysés comme décrit ci-
25 dessous.

c) Détection de la séquence cible

10 µl de chacun des surnageants de transcription sont déposés par la technique de dot-blot, sur membrane de Nylon N+ (Amersham), après dilution dans 90 µl
30 de H₂O et dénaturation 4 min à 90°C. L'ARN est fixé par irradiation UV ; des dépôts de dilutions d'ARN cible initial sont conjointement réalisés dans les mêmes conditions sur la membrane. La membrane est ensuite incubée dans des conditions favorisant l'hybridation spécifique
35 avec une sonde reconnaissant la séquence amplifiée, conformément à l'invention et la séquence cible initiale.

Cette sonde est un oligonucléotide de synthèse (Z) de séquence :

(Z) 5' GCC GCT GAA GGG CTT 3'.

Cet oligonucléotide de synthèse est marqué à son extrémité 5' par du ^{32}P par réaction de la polynucléotide kinase en présence de $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$.

Après lavages, les membranes sont autoradiographiées et chaque dot est découpé et compté en présence de liquide de scintillation. Les résultats du comptage sont reportés ci-dessous, après soustraction du résultat du blanc (obtenu par réalisation de l'essai lorsque la concentration initiale en ARN cible est nulle).

* Résultats après mise en oeuvre du procédé selon l'invention :

15	ARN cible initial	signal mesuré (cpm)
	2,3 pmoles	6475
	0,23 pmoles	2515
	23 fmoles	1155
	2,3 fmoles	611
20	0,23 fmoles	42

* Résultats du témoin non amplifié :

	ARN cible initial	signal mesuré (cpm)
	7 pmoles	9471
	0,7 pmoles	1607
25	70 fmoles	271
	7 fmoles	76
	0,7 fmoles	61

Les résultats peuvent être reportés sur une courbe $\log(\text{signal})$ en fonction du $\log(\text{quantité initiale de cible})$. Les deux courbes obtenues sont linéaires, dès que le signal, dans les conditions utilisées pour la mesure, est au-dessus du bruit de fond (figure 3 et figure 4). Ces figures montrent que la cible a été détectée de manière sensible et spécifique à l'aide du procédé selon l'invention. Cette amplification est mesurée par la

différence de quantité de cible initiale avec amplification et sans amplification donnant un signal identique.

La limite supérieure de cet essai dépend des quantités initiales de construction polynucléotidique présente dans le milieu d'hybridation. L'amplification est limitée lorsque la concentration initiale de la sonde (domaine (A)) est inférieure à la concentration initiale de la cible, elle est par contre plus importante au fur et à mesure que la quantité de cible devient inférieure à la quantité de sonde. Cet effet est expliqué par les lois générales régissant l'hybridation d'une sonde sur sa cible.

Des courbes standards avec des étalons connus peuvent être établies et ainsi permettre la quantification d'un échantillon amplifié dans les mêmes conditions que celles utilisées lors de l'établissement des courbes standards.

De manière préférée, la construction polynucléotidique est à une concentration inférieure à 5 pmoles.

EXEMPLE 7 : Amplification d'une cible et détection des ARN transcrits, après hybridation en solution avec une sonde spécifique et capture sur phase solide des duplex formés.

Le principe de l'essai est le même que celui décrit dans l'exemple précédent. L'enzyme utilisée est la nucléase S1 (40 U pour 50 µl), la digestion a lieu en présence de 2,5 µg d'ADN de sperme de hareng et 0,05 mg/ml de BSA. La digestion se déroule 20 min à température ambiante. Un marqueur (³²P) est incorporé dans l'ARN transcrit par addition de α-³²P-UTP (0,2 µl par réaction, 800 Ci/mmol, 20 mCi/ml) au milieu de transcription. 10 µl de surnageant de transcription sont prélevés et hybridés en solution en présence de 11 pmoles de sonde (Z) biotinylée à son extrémité 5', dans 30 µl de tampon

SSC 2X, contenant 25 mM d'HEPES pH 7,4 et 2 mM d'EDTA. Une hybridation de 15 min à 37°C est réalisée après une étape de dénaturation de 5 min à 70°C. Les solutions sont ensuite transférées dans des puits recouverts d'avidine, contenant 10 µl de SSC 2X. La fixation se déroule 1 heure à 37°C. Les puits sont ensuite lavés avec un tampon PBS + NaCl 0,5 M contenant 0,05 % de Tween 20. Les cupules sont comptées directement dans un compteur β.

* Résultats :

10	ARN cible initial	signal mesuré (cpm)
	23 fmoles	2526
	2,3 fmoles	1334
	0,23 fmoles	1011
	0	435

15 EXEMPLE 8 : Test de la capacité de transcription de la sonde/promoteur en solution.

La sonde (X) et le promoteur (Y) sont hybridés comme décrit dans l'exemple 1 c). Les acides nucléiques présents en solution sont ensuite précipités par 5 µl d'acétate de sodium 3M, pH 5,5 avec 100 µl d'éthanol 100 %, 30 minutes à -70°C. Après 15 minutes de centrifugation (10 000 trs/min, 4°C), le culot est lavé par 100 µl d'éthanol 80 % et reprécipité dans les mêmes conditions.

25 Le culot final est séché et repris par la solution de transcription décrite dans l'exemple 3.

Après 1 heure 30 minutes de transcription à 37°C, 7 µl de la solution sont prélevés et analysés sur gel d'agarose/Nusieve® (1 %/2 %), en présence de bromure d'éthidium. On observe sur le gel :

30 - une bande correspondant à l'hybride promoteur/sonde ((X)/(Y)) (construction nucléotidique conforme à l'invention),

- une bande correspondant à l'hybride promoteur/sonde/ARN transcrit avec un profil de migration plus lent,

- une bande plus courte correspondant à l'ARN transcrit en solution.

L'autoradiographie du gel montre la présence de radioactivité au niveau de la bande la plus courte (transcrit) et de la bande la plus longue (promoteur/sonde/transcrit).

La même expérimentation réalisée sans T7 ARN polymérase ne permet la visualisation que de la construction conforme à l'invention (promoteur/sonde) sur le gel.

EXEMPLE 9 : Amplification d'une cible selon le procédé de l'invention et détection colorimétrique des ARN transcrits après immobilisation par une sonde fixée sur microbille.

Le principe de l'essai est le même que celui décrit à l'Exemple 7.

L'enzyme de digestion utilisée est la Mung-Bean nucléase (50 U par essai). La digestion a lieu en présence de 0,05 mg/ml de BSA, pendant 20 min à 37°C.

20 pmoles de sonde (Z) biotinylée en 5', sont fixées sur des microbilles recouvertes d'avidine. La transcription se déroule en présence des billes fonctionnalisées avec la sonde Z, dans un volume final de 50 µl, en présence de ribonucléotides non marqués.

A la fin de la transcription, 20 µl du milieu de transcription contenant les billes sont prélevés et placés dans un tube. On rajoute 20 pmoles (5 µl) de sonde (R) marquée au dinitrophényle à son extrémité 5' (séquence de (R) = 5' AAA CCT TAT TGA TGC 3') et 25 µl de tampon PBS + NaCl 0,5 M contenant 3 % de BSA. L'hybridation se déroule 1 heure à 37°C.

Les billes sont ensuite récupérées, lavées 3 fois avec 100 µl de tampon PBS + NaCl 0,5 M + Tween 20

0,05 %. Les transcrits capturés sur billes et hybridés avec la sonde (R) (DNP) sont incubés dans 50 µl de tampon PBS contenant 3 % de BSA et un conjugué anticorps monoclonal anti-DNP couplé à la peroxydase (AMPLICIS-DNP kit ; CIS BIO INTERNATIONAL, dilution 1/50 000). On effectue 3 lavages dans 100 ml de tampon PBS + NaCl 0,5 M + Tween 0,05 %.

La révélation se déroule dans 50 µl de solution OPD (orthophénylènediamine - DNP kit-CIS BIO INTERNATIONAL) 30 min à l'obscurité. Les valeurs de DO sont mesurées à 492 nm, après addition de 100 µl d'acide oxalique.

Parallèlement, on effectue une hybridation sandwich sur des dilutions de l'ARN cible (10 µl) non soumis au procédé de l'invention, en présence de 20 pmoles (5 µl) de sonde (Z) fixée sur microbilles et 20 pmole (5 µl) de sonde R marquée au DNP, et 25 µl de tampon PBS + NaCl 0,5 M. L'hybridation se déroule 1 heure à 37°C. Les billes sont ensuite lavées et incubées avec de l'anticorps comme décrit ci-dessus.

Résultats (DO 492 nm) :

Le Tableau ci-après et la figure 6 (abscisse : pmoles d'ARN cible ; ordonnée : DO à 492 nm) illustrent les résultats (courbe (■) : après amplification selon l'invention ; courbe (O) : par détection directe).

ARN cible (pmoles)	Après procédé selon l'invention (DO)	Sans amplification (DO)
$2 \cdot 10^{-12}$	3,25	0,31
$2 \cdot 10^{-13}$	2,38	0,41
$2 \cdot 10^{-14}$	1,34	0,09
$2 \cdot 10^{-15}$	0,2	0,08
$2 \cdot 10^{-16}$	0,4	0,05
$2 \cdot 10^{-17}$	0,4	non testé
$2 \cdot 10^{-18}$	0,2	non testé

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de

mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: CIS BIO INTERNATIONAL
- (B) RUE: RN 306
- (C) VILLE: SACLAY
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 91400

- (ii) TITRE DE L' INVENTION: METHODE D'AMPLIFICATION ET/OU DE DETECTION D'UNE SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE, REACTIF DE DETECTION ET LEURS APPLICATIONS.

- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 5

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "SONDE SYNTHETIQUE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CCTAATACGA CTCACTATAG GGG

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 52 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "SONDE SYNTHETIQUE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GCCGCTGAAG GGCTTCTTCC TTATTGATGC CCCTATAGTG AGTCGTATTA GG

52

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "SONDE SYNTHETIQUE"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CATCAATAAG GAAGAAGCCC TTCAGCGGC

29

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "SONDE SYNTHETIQUE"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GCCGCTGAAG GGCTT

15

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "SONDE SYNTHETIQUE"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

AAACCTTATT GATGC

15

REVENDEICATIONS

1°) Procédé d'amplification d'au moins une séquence d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend :

5 (1) l'hybridation en solution d'au moins une séquence cible avec une construction polynucléotidique comprenant au moins un domaine (A) simple-brin correspondant à une séquence nucléotidique complémentaire de la séquence cible et un domaine (B,B') double-brin constituant un promoteur,

(2) la séparation des acides nucléiques,

(3) la digestion par une nucléase spécifique des acides nucléiques simple-brin des fragments simple-brin des constructions polynucléotidiques, c'est-à-dire
15 notamment celles n'ayant pas formé d'hybrides avec la séquence cible, et

(4) la transcription en solution et en présence d'une ARN-polymérase ADN-dépendante, de la séquence cible ayant hybridé à l'étape (1), sous la forme de
20 copies multiples d'ARN de ladite séquence cible.

2°) Procédé d'amplification selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape (2) de séparation comprend avantageusement une étape de précipitation des acides nucléiques.

25 3°) Procédé d'amplification selon la revendication 1, caractérisé en ce que la construction polynucléotidique de l'étape (1) comprend au moins un domaine (A) simple-brin correspondant à une séquence nucléotidique complémentaire de la séquence cible, un domaine
30 (B,B') double-brin constituant un promoteur, un domaine (C) constitué par un bras espaceur, non hydrolysable par des nucléases spécifiques des acides nucléiques simple-brin et un domaine (D) constitué par un système de fixation à un support.

35 4°) Procédé d'amplification selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'étape (2) de séparation comprend avantageusement une étape de fixation sur un

support approprié des constructions polynucléotidiques comportant le domaine (D), suivie d'une étape d'élimination des éléments non fixés.

5 5°) Procédé d'amplification selon la revendication 4, caractérisé en ce que la capacité du support est choisie de telle sorte que tous les composés comportant le domaine (D) puissent se fixer, sans qu'il y ait compétition entre eux.

10 6°) Procédé de détection et de quantification d'au moins une séquence d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) l'hybridation en solution d'au moins une séquence cible avec une construction polynucléotidique comprenant au moins un domaine (A) simple-brin correspondant à une séquence nucléotidique complémentaire de la 15 séquence cible et un domaine (B,B') double-brin constituant un promoteur,

(2) la séparation des acides nucléiques,

(3) la digestion par une nucléase spécifique 20 des acides nucléiques simple-brin des fragments simple-brin des constructions polynucléotidiques, c'est-à-dire notamment celles n'ayant pas formé d'hybrides avec la séquence cible à détecter,

(4) la transcription en solution et en présence d'une ARN-polymérase ADN-dépendante, de la séquence 25 cible ayant hybridé à l'étape (1), sous la forme de copies multiples d'ARN de ladite séquence cible, et

(5) la détection et/ou la quantification des transcrits produits.

30 7°) Procédé de détection selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'étape (2) de séparation comprend avantageusement une étape de précipitation des acides nucléiques.

8°) Procédé de détection selon la revendica- 35 tion 6, caractérisé en ce que la construction polynucléotidique de l'étape (1) comprend au moins un domaine (A) simple-brin correspondant à une séquence nucléotidique

complémentaire de la séquence cible, un domaine (B,B') double-brin constituant un promoteur, un domaine (C) constitué par un bras espaceur, non hydrolysable par des nucléases spécifiques des acides nucléiques simple-brin et un domaine (D) constitué par un système de fixation à un support.

9°) Procédé de détection selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'étape (2) de séparation comprend avantageusement une étape de fixation sur un support approprié des constructions polynucléotidiques comportant le domaine (D), suivie d'une étape d'élimination des éléments non fixés.

10°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'étape (1) comprend simultanément la formation *in situ* de la construction polynucléotidique par hybridation d'une séquence comprenant au moins de 5' en 3' le domaine (A) et le domaine (B) avec une séquence comprenant au moins le domaine (B') et de préférence en outre le domaine (D) et le domaine (C) et l'hybridation de ladite construction polynucléotidique ainsi formée et de la séquence cible.

11°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'étape (4) de transcription est réalisée en présence de désoxynucléotides modifiés tels que l' α -³²P-UTP, le dinitrophényl-UTP, la biotine-UTP, la digoxigénine-UTP.

12°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 11, caractérisé en ce que lorsque les transcrits sont réalisés en présence de désoxynucléotides modifiés, l'étape (5) de détection comprend la capture desdits transcrits modifiés par une sonde spécifique d'une portion située au centre ou à l'extrémité 3' desdits transcrits et la détection des marqueurs incorporés dans lesdits transcrits par des systèmes de révélation convenables.

13°) Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la sonde de détection fait avantageusement entre 15 et 200 bases de long et peut être modifiée à une de ses extrémités par une molécule permettant sa
5 fixation sur un support.

14°) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'étape (5) est réalisée en solution, par hybridation du transcrit formé lors de l'étape (4) avec une sonde de détection, dans des conditions favorisant la formation du duplex spécifique et les hybrides
10 ainsi formés sont ensuite immobilisés sur des supports modifiés.

15°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, caractérisé en ce que l'étape (5) de
15 détection comprend la fixation des transcrits non modifiés sur un support solide et leur hybridation avec une sonde de détection spécifique marquée.

16°) Construction polynucléotidique apte à amplifier et/ou éventuellement à détecter une séquence
20 cible d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle comprend :

(a) un premier domaine (A), qui est simple-brin et comprend une séquence nucléotidique complémentaire de la séquence cible,

25 (b) un deuxième domaine (B,B'), situé à l'extrémité 3' dudit domaine (A), qui est formé de deux séquences complémentaires (B) et (B') et forme un promoteur double-brin d'une ARN polymérase ADN-dépendante,

(c) un troisième domaine (C), constitué par un
30 bras espaceur, non hydrolysable par des nucléases spécifiques des acides nucléiques simple-brin, et

(d) un quatrième domaine (D), constitué par un système de fixation du domaine (B,B') sur un support solide convenable,

35 lesquels domaines (C) et (D) peuvent être avantageusement fixés soit en 5' du domaine (B'), soit en 5' du domaine

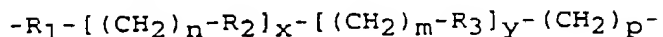
(A), soit en 3' du domaine (B) et forment un système d'accrochage.

17°) Construction polynucléotidique selon la revendication 16, caractérisée en ce que le domaine (B,B') constitue l'un des promoteurs suivants : promoteur de la T7 ARN polymérase, promoteur de la T3 ARN polymérase, promoteur de la SP6 ARN polymérase.

18°) Construction polynucléotidique selon la revendication 16 ou la revendication 17, caractérisée en ce que des séquences peuvent être ajoutées à l'extrémité 3' et/ou à l'extrémité 5' du domaine (B).

19°) Construction polynucléotidique selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, caractérisée en ce que la taille de la séquence formée par les domaines (A) et (B) est comprise entre 30 et 200 bases.

20°) Construction polynucléotidique selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, caractérisée en ce que le domaine (C) ou bras espaceur est avantageusement constitué de 2 à 10, de préférence de 4 à 6 synthons, choisis parmi les alcanes-diol ou les synthons qui répondent à l'une des formules suivantes :



dans laquelle :

n est un nombre entier de 1 à 10 ;

m est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 10 ;

p est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 10 ;

x est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 8 ;

y est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 8 ;

R₁, R₂ et R₃, qui peuvent être identiques ou différents représentent

CH₂ ; O ; S ; NR' ; CO ; CH=CH ; NR'CO ; CONR' ; NHSO₂ ; R'PO₄,

où R' représente un atome d'hydrogène ou une chaîne alkyle en C₁ à C₁₂.

21°) Construction polynucléotidique selon l'une quelconque des revendications 16 à 20, caractérisée en ce que le domaine (D) est avantageusement un oligonu-

cléotide, un haptène, du dinitrophényle, une biotine, ou une digoxigénine.

22°) Procédé de production d'une construction polynucléotidique selon l'une quelconque des revendications 16 à 21, caractérisé en ce qu'il comprend :

(a) la synthèse du segment dénommé promoteur comprenant le domaine (D), le domaine (C) (bras espaceur) et le domaine 5'-(B')-3' (correspondant à un simple-brin d'un promoteur),

(b) la synthèse du segment dénommé sonde, comprenant le domaine 3'-(B) (correspondant à une séquence simple-brin complémentaire de (B')), le domaine (A)-5' (séquence simple-brin complémentaire de la séquence cible à détecter) et

(c) l'hybridation des domaines (B) et (B'), des segments obtenus en (a) et (b), dans des conditions stringentes.

23°) Procédé de production d'une construction polynucléotidique selon l'une quelconque des revendications 16 à 21, caractérisé en ce qu'il comprend :

(a) la synthèse du segment dénommé promoteur comprenant uniquement le domaine 5'-(B')-3' (correspondant à un simple-brin d'un promoteur),

(b) la synthèse du segment dénommé sonde, comprenant le domaine 3'-(B) (correspondant à une séquence simple-brin complémentaire de (B')), le domaine (A)-5' (séquence simple-brin complémentaire de la séquence cible à détecter) et en 3' ou en 5' dudit segment, le domaine (C) (bras espaceur) et le domaine (D) (système d'accrochage), et

(c) l'hybridation des domaines (B) et (B'), des segments obtenus en (a) et (b), dans des conditions stringentes.

1/6

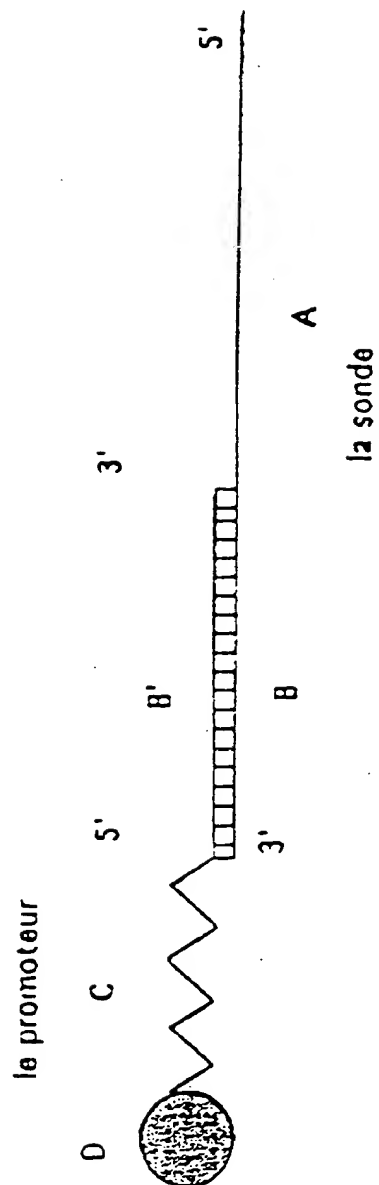


FIGURE 1

2/6

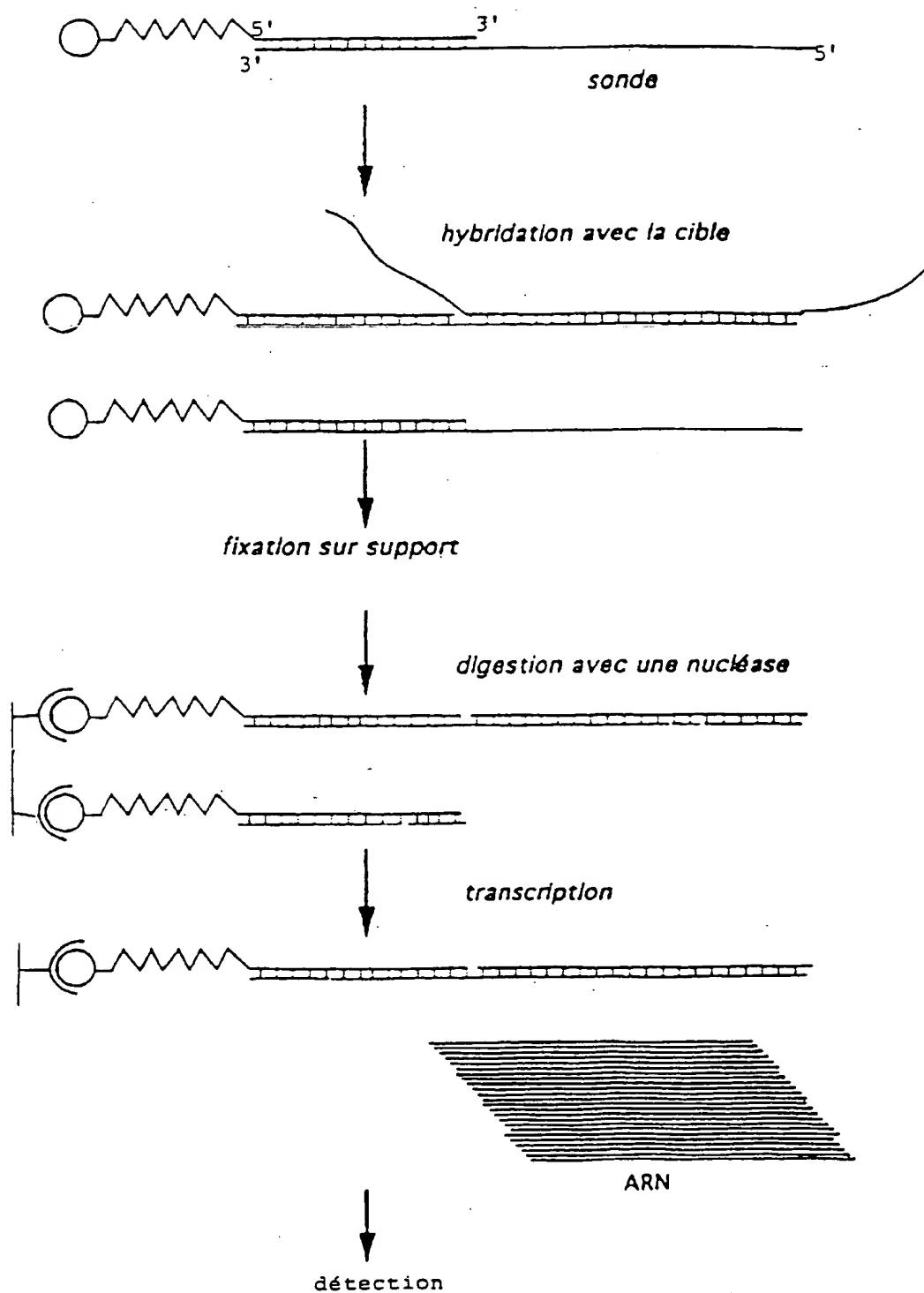


FIGURE 2

3/6

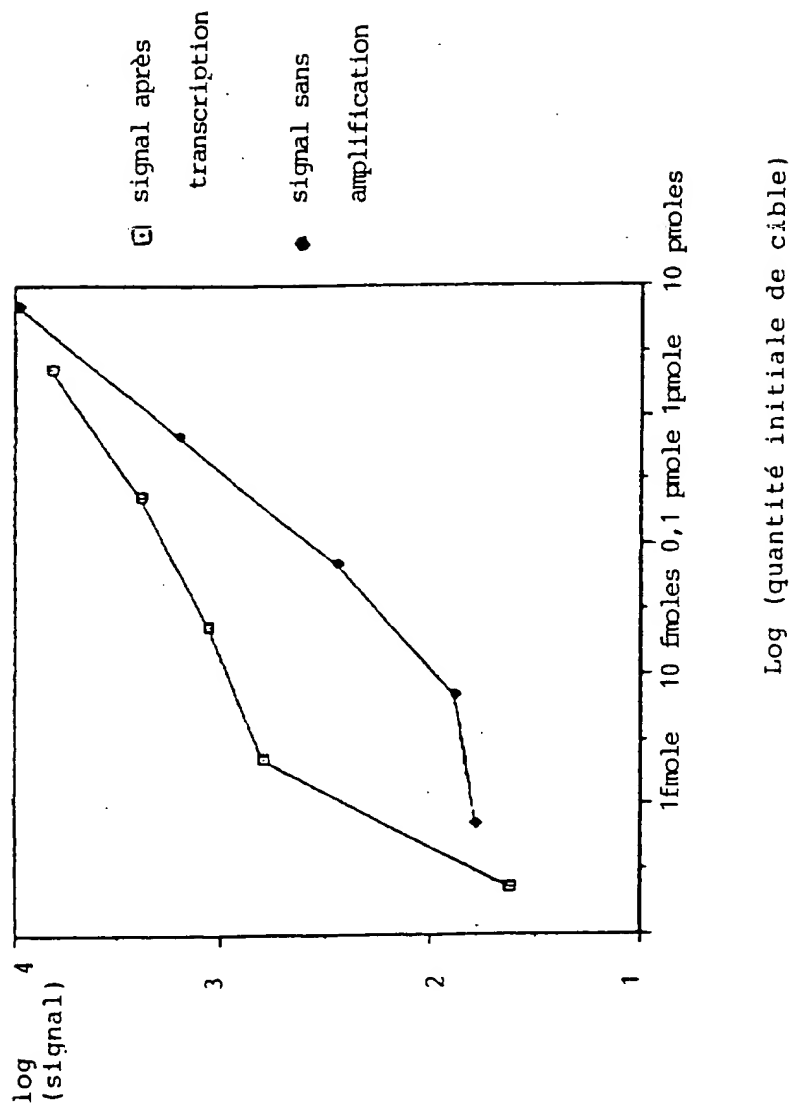


FIGURE 3

4/6

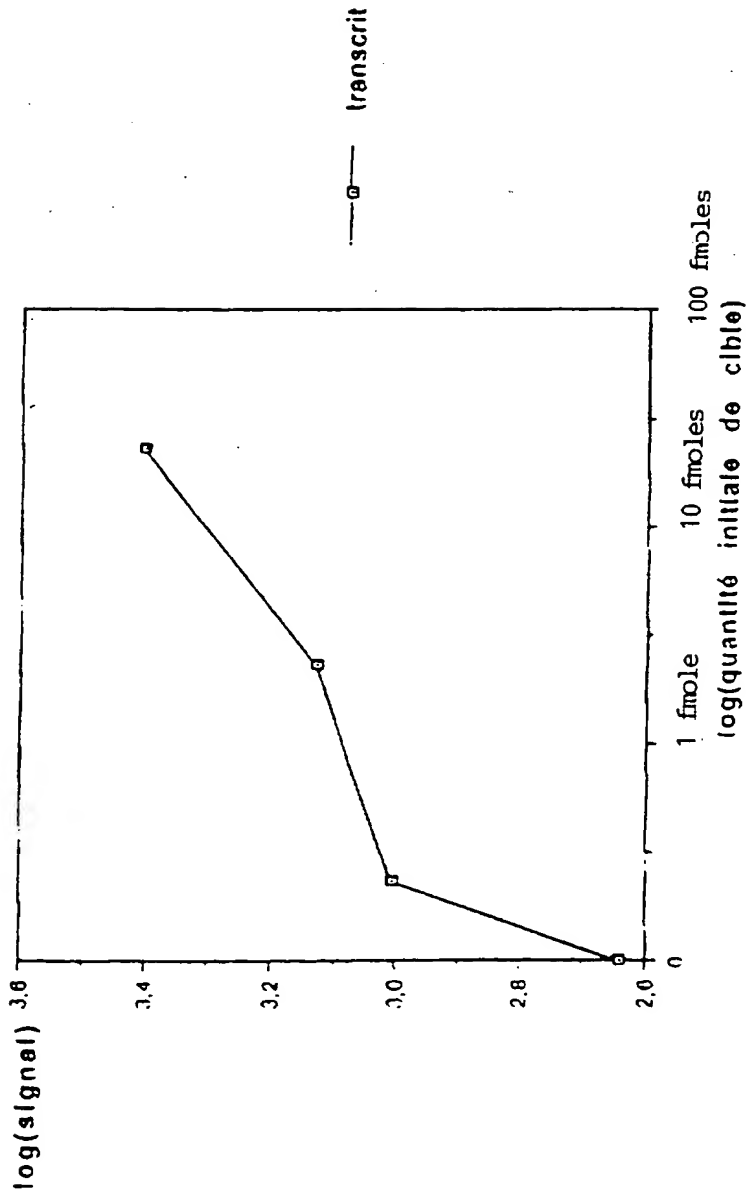


FIGURE 4

5 / 6

5' biotine-[stop]5'-CCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GG
 GGA TTA TGC TGA GTG ATA TCC CCG TAG TTA TTC CTT CTT CGG GAA GTC GCC G 5'
 Domaine D Domaine C Domaine B'
 Domaine B Domaine A

FIGURE 5

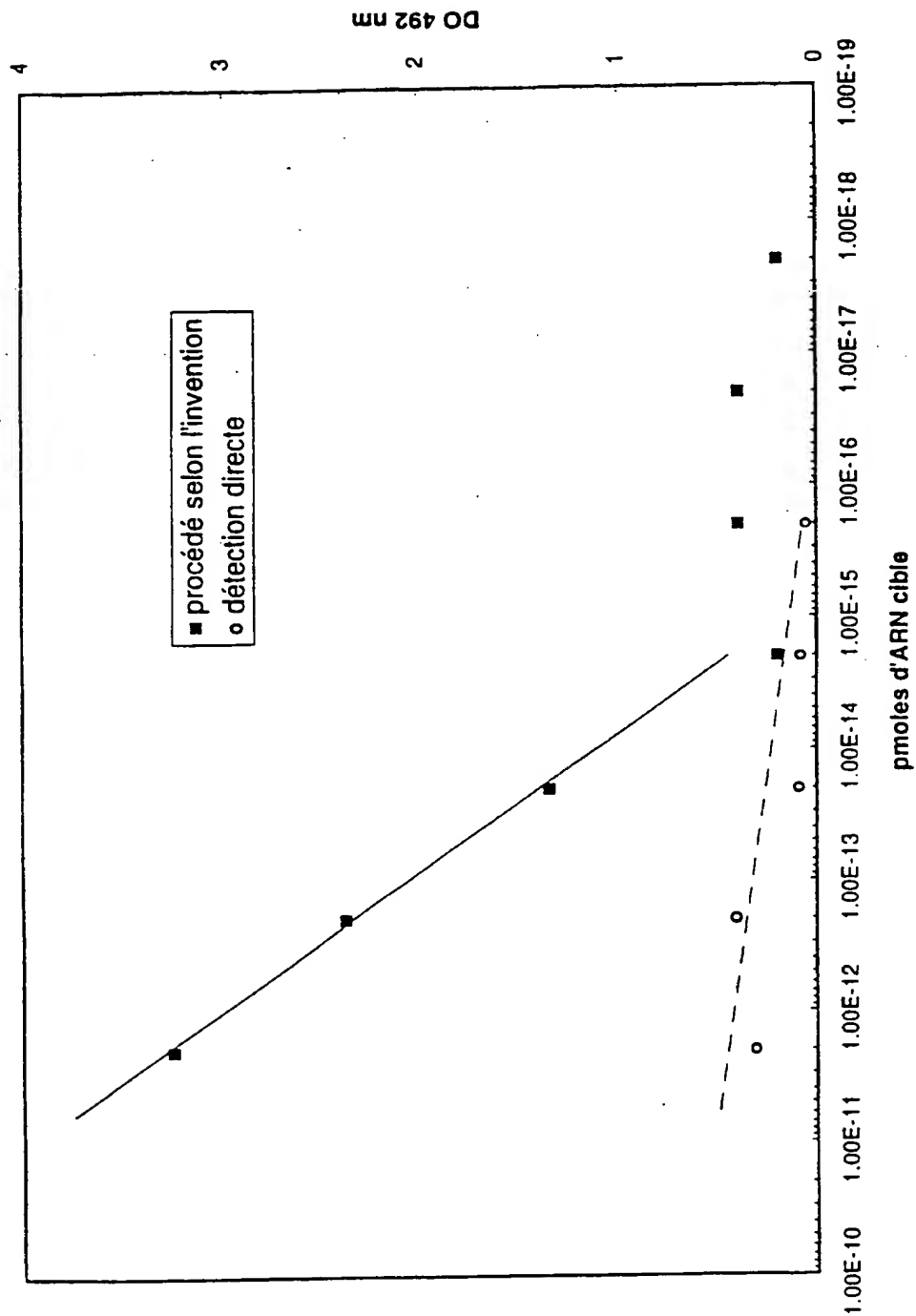


FIGURE 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No
PCT/FR 95/01047

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP-A-0 427 074 (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC) 15 May 1991	1
A	see the whole document	2-19,22, 23
Y	--- WO-A-89 09285 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 5 October 1989 see page 3, line 19 - page 4, line 29 see page 10, line 31 - page 12, line 6	1
A	--- WO-A-92 12261 (PROMEGA CORPORATION) 23 July 1992 see page 44, line 35 - page 48, line 2 see page 52, line 25 - page 53, line 33 --- -/-	1,6,10, 16,22,23

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 October 1995

Date of mailing of the international search report

21.11.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No
PCT/FR 95/01047

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP-A-0 545 010 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 9 June 1993 see page 2, line 51 - page 6, line 12 see page 7, line 30 - page 9, line 15 ----	1-19, 21-23
A	FR-A-2 697 851 (BIO MERIEUX) 13 May 1994 see the whole document ----	1,3-5,8, 9,16, 21-23
A	WO-A-90 02819 (THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 22 March 1990 see page 17, line 30 - page 19, line 20 =====	16-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01047

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0427074	15-05-91	AU-B- 642922 AU-B- 6594990 IL-A- 96250 JP-A- 4008292	04-11-93 16-05-91 07-10-94 13-01-92
WO-A-8909285	05-10-89	US-A- 4999290 AU-B- 3534589	12-03-91 16-10-89
WO-A-9212261	23-07-92	AU-B- 2022295 AU-B- 9165091 EP-A- 0519053	21-09-95 17-08-92 23-12-92
EP-A-0545010	09-06-93	DE-A- 4213029 JP-A- 5244951	01-04-93 24-09-93
FR-A-2697851	13-05-94	NONE	
WO-A-9002819	22-03-90	EP-A- 0433363 JP-T- 4500457	26-06-91 30-01-92

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: Internationale No
PCT/FR 95/01047

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12Q1/68		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP-A-0 427 074 (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC) 15 Mai 1991	1
A	voir le document en entier	2-19,22, 23
Y	WO-A-89 09285 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 5 Octobre 1989 voir page 3, ligne 19 - page 4, ligne 29 voir page 10, ligne 31 - page 12, ligne 6	1
A	WO-A-92 12261 (PROMEGA CORPORATION) 23 Juillet 1992 voir page 44, ligne 35 - page 48, ligne 2 voir page 52, ligne 25 - page 53, ligne 33	1,6,10, 16,22,23
	--- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) " " document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "A" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 26 Octobre 1995		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 21.11.95
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé De Kok, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. internationale No
PCT/FR 95/01047

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP-A-0 545 010 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 9 Juin 1993 voir page 2, ligne 51 - page 6, ligne 12 voir page 7, ligne 30 - page 9, ligne 15 ---	1-19, 21-23
A	FR-A-2 697 851 (BIO MERIEUX) 13 Mai 1994 voir le document en entier ---	1,3-5,8, 9,16, 21-23
A	WO-A-90 02819 (THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 22 Mars 1990 voir page 17, ligne 30 - page 19, ligne 20 -----	16-20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/01047

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0427074	15-05-91	AU-B- 642922	04-11-93
		AU-B- 6594990	16-05-91
		IL-A- 96250	07-10-94
		JP-A- 4008292	13-01-92

WO-A-8909285	05-10-89	US-A- 4999290	12-03-91
		AU-B- 3534589	16-10-89

WO-A-9212261	23-07-92	AU-B- 2022295	21-09-95
		AU-B- 9165091	17-08-92
		EP-A- 0519053	23-12-92

EP-A-0545010	09-06-93	DE-A- 4213029	01-04-93
		JP-A- 5244951	24-09-93

FR-A-2697851	13-05-94	AUCUN	

WO-A-9002819	22-03-90	EP-A- 0433363	26-06-91
		JP-T- 4500457	30-01-92
